

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

С. Г. Стёпин¹, Н. В. Железняк¹, О. Г. Мырадов¹, Е. А. Дикусар²

СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПОЛУАМИНАЛЕЙ И ОСНОВАНИЙ ШИФФА НА ОСНОВЕ СУЛЬФАНИЛАМИДА

¹Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
г. Витебск, Республика Беларусь

²Институт физико-органической химии НАН Беларуси,
г. Минск, Республика Беларусь

Конденсацией сульфаниламида с соответствующими альдегидами в абсолютном кипящем метаноле в присутствии каталитических количеств уксусной кислоты синтезированы: 4-[гидрокси(5-*n*-толилзоксазол-3-ил)метил]аминобензолсульфонамид, 4,4'-(1*E*,1'*E*)-1,4-фениленбис(метанилиден)бис(азанилиден)дибензолсульфонамид, (E)-4-сульфамойлфенил-иминометилбензойная кислота, метил (E)-4-сульфамойлфенил-иминометилбензоат, (E)-4-ферроценилметиленаминобензолсульфонамид, (E)-4-фенантрен-9-илметиленаминобензолсульфонамид. (E)-4-(*N,N*-диметиламинофенилиминометил)бензойная кислота получена выдержкой в ультратермостате при 65 °С этанольных растворов *n*-аминобензойной кислоты и *n*-диметиламинобензальдегида с использованием в качестве катализатора концентрированной уксусной кислоты. Строение синтезированных соединений подтверждено данными ИК-, УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии. Продолжительность реакции 30–60 мин, выходы целевых соединений 80–90 %.

Микрометодом серийных разведений исследована антибактериальная активность синтезированных соединений в отношении *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*. Предварительно для микробиологических исследований был подобран растворитель полученных образцов и его концентрация. Антибактериальную активность полученных соединений определяли визуально и подтверждали турбидиметрическим методом. Установлена антибактериальная активность 5 исследованных соединений в отношении *E.coli*, *B.subtilis* и *S.aureus*. Наиболее высокую антибактериальную активность показали азометины, содержащие иминометилфенилалкоксихарбонильный фрагмент.

Ключевые слова: сульфаниламид, *n*-аминобензойная кислота, основания Шиффа, полуаминалы, ароматические альдегиды, антибактериальная активность.

ВВЕДЕНИЕ

В силу высокой скорости возникновения устойчивости бактерий к антибиотикам и другим антибактериальным средствам поиск потенциальных лекарственных средств и проведение QSAR моделирования (количественное соотношение структура-свойство) на основании известных активных структур являются актуальной областью научных исследований в медицинской и фармацевтической химии.

Многие антибактериальные лекарственные средства из группы сульфаниламидов потеряли свою актуальность по причине частых проявлений резистентности у бактерий. Так, например, в настоящее время почти не используется в медицине сульфаниламид –

дешёвое антибактериальное средство, которое применяется только наружно в виде порошка. До настоящего времени рациональными являются комбинации сульфаниламидов с триметопримом – ингибитором дигидрофолатредуктазы: бактрим (триметоприм + сульфаметоксазол), лидаприм (триметоприм + сульфаметрол), сульфатон (триметоприм + сульфамонотоксин), а также потесептил (сульфадимезин + триметоприм). Сульфацил натрия используется в виде глазных капель. Фталазол, этазол, сульфадимезин, уросульфан, сульфопиридазин, сульфадиметоксин назначают внутрь для лечения кишечных бактериальных инфекций [5].

Исследования связи структуры сульфаниламидов и их фармакологического действия являются необходимой частью

поиска новых высокоактивных антибактериальных лекарственных средств на основе сульфаниламидов.

Основания Шиффа обладают многофакторным действием, проявляя противосудорожную, противовоспалительную, противотуберкулезную, гепатопротекторную, антиоксидантную, анальгетическую [1], бактерицидную [1–8] противоопухолевую [1, 9], противовирусную [10] активность.

Одним из возможных направлений поиска новых антибактериальных лекарственных средств является модифицирование структуры сульфаниламидов по аминогруппе с получением их азометиновых производных [2–4]. Промежуточными продуктами синтеза оснований Шиффа являются полуаминали. Полуаминали практически неисследованные перспективные потенциальные лекарственные средства [11]. Интересными суперантимутагенными свойствами обладает *n*-аминобензойная кислота [12].

Поскольку сульфаниламид является довольно маленькой молекулой, существует не так много вариаций, которые могут быть выполнены без изменения основного ядра. Дальнейшие работы по изучению связи структуры и действия были направлены на молекулярную модификацию сульфаниламидов и в настоящее время являются актуальными.

В настоящее время существует большее число методов модификации известных лекарственных средств. Следует отметить ряд литературных обзоров по исследованию биологической активности лекарственных средств [8–11]. Интересным подходом является введение в молекулы потенциальных лекарственных средств металлоценовых группировок [12]. Перспективными и малоизученными являются азометиновые производные различных классов лекарственных средств [13–19].

Представляется интересным провести попытку синтеза потенциальных бактерицидных средств путем модифицирования структур сульфаниламида и *n*-аминобензойной кислоты. В случае успеха можно получить соединения, конкурентно связывающиеся с ферментами метаболизма *n*-аминобензойной кислоты.

Целью настоящей работы является изучение и сравнение антибактериальной активности азометиновых и полуаминальных производных сульфаниламида и *n*-аминобензойной кислоты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведение химических исследований. Инфракрасные спектры (ИК) синтезированных соединений записывали на ИК Фурье-спектрофотометре Protégé-460 фирмы Nicolet в таблетках калия бромид.

Электронные спектры снимали на спектрофотометре «СФ-2000 ОКБ СПЕКТР» в растворе: этанол-диметилсульфоксид 1:3.

Масс-спектры получены на приборе Agilent 5975 inert MSD/6890N Network GC System в режиме ионизации электронным ударом с энергией электронов 70 эВ; капиллярная колонка HP-5MS (30 м x 0,25 мм x 0,25 мкм); фаза – 5 % PhMe Silicone; температура испарителя +250 °С.

Для синтеза использовали стрептоцид порошок для наружного применения РУП «Белмедпрепараты», г. Минск.

Синтез производных сульфаниламида I–VI. Раствор 5 ммоль стрептоцида и 5 ммоль соответствующего альдегида (или 2,5 ммоль диальдегида) в 30 мл абсолютного метанола в присутствии 2 капель ледяной уксусной кислоты кипятили 30–50 мин. Горячий раствор фильтровали через бумажный складчатый фильтр, охлаждали и оставляли на 10–15 ч при температуре 0–5 °С. Образовавшиеся соединения отделяли фильтрованием на стеклянном пористом фильтре или декантацией, промывали небольшим количеством (2–5 мл) холодного метанола и сушили на воздухе при 50 °С в течение 24 ч.

4-{[Гидрокси(5-*n*-толилизоксазол-3-ил)метил]амино}бензолсульфонамид (I). Выход 80 %, т. пл. 207–209 °С. ИК-спектр, ν , см⁻¹: 3347, 3255, 3144, 1604, 1520, 1510, 1457, 1384, 1337, 1328, 1313, 1160, 1097, 1055, 1036, 909, 822, 794, 784, 713, 661, 584, 540, 501. УФ-спектр, λ нм: 257, 267, 279, 292, 301. $[M]^+$ 359. C₁₇H₁₇N₃O₄S. М 359,40.

4,4'-(1*E*,1'*E*)-1,4-Фениленбис-(метанилиден)бис(азанилиден)дibenзолсульфонамид (II). Выход 79 %, т.пл. 273–274 °С. УФ-спектр, λ нм: 257, 267, 279, 292, 305, 318, 338 [13].

(*E*)-4-Сульфамойлфенилиминометилбензойная кислота (III). Выход 82 %, т.пл. 273–274 °С. УФ-спектр, λ нм: 257, 267, 278, 290 [13].

Метил (*E*)-4-сульфамойлфенилиминометилбензоат (IV). Выход 84 %, т.пл. 234–235 °С. УФ-спектр, λ нм: 257, 266, 276, 291, 305, 318, 338, 356, 375 [13].

(*E*)-4-Ферроценилметиленамино-

бензолсульфонамид (V). Выход 80 %, т.пл. 129–130 °С. УФ-спектр, λ нм: 257, 268,6, 278, 290, 324, 342, 356 [13].

(Е)-4-Фенантрен-9-илметиленаминобензолсульфонамид (VI). Выход 88 %, т.пл. 160–162 °С. УФ-спектр, λ нм: 259, 268, 279, 292, 306, 320,339, 358, 377 [13].

Синтез производного п-аминобензойной кислоты (VII). Раствор 1 ммоль *p*-аминобензойной кислоты и 1 ммоль *p*-диметиламинобензальдегида растворили в 30 мл абсолютного этанола в присутствии 2 капель ледяной уксусной кислоты, довели до кипения и поместили в воздушный термостат, нагретый до температуры 65 °С, выдержали в термостате 1 час и оставили охлаждаться до комнатной температуры в течение 12 ч, затем охлаждали в общей камере холодильника в течение 12 ч. Образовавшиеся соединения отделяли фильтрованием на стеклянном пористом фильтре, промывали небольшим количеством холодного этанола и сушили на воздухе при 20 °С в течение 24 ч.

(Е)4-(N,N-Диметиламинофенил-иминометил)бензойная кислота (VII). Выход 89 %, т.пл. 286–287 °С (с разложением). ИК-спектр, ν , см⁻¹: 3443, 2921, 2888, 2852, 2818, 1680 1585, 1551, 1527, 1418, 1364, 1311, 1286, 1229, 1163, 1123, 1103, 944, 851, 818, 728, 650,543. $[M]^+$ 268. C₁₆H₁₆N₂O₂. М 268,32.

Приготовление растворов для микробиологических испытаний. Антибактериальную активность полученных соединений определяли микрометодом серийных разведений в жидкой питательной среде [14].

Выбор растворителя для микробиологических испытаний представлял собой серьезную задачу из-за низкой растворимости исследуемых соединений. В работе [22] приготовление растворов азометиновых производных сульфаниламида иного строения для микробиологических испытаний проводили с использованием 20 % раствора диметилсульфоксида в воде. Однако синтезированные нами соединения растворялись только в 50 % водном растворе диметилсульфоксида, и при последовательных разбавлениях они выпадали из раствора, что делало невозможным проведение микробиологических испытаний.

Растворитель, подходящий для исследований, был подобран путём изучения растворимости образцов с исключением антибактериальной активности самого рас-

творителя. Наилучшим растворителем для микробиологических испытаний оказался полиэтиленгликоль (ПЭГ-400). Каждый образец был растворён в ПЭГ-400 с получением растворов веществ с концентрацией 2 мг/мл. Растворение происходило в течение 24 часов. Полученный матричный раствор был разведён водой дистиллированной стерильной до концентрации 1 мг/мл непосредственно перед исследованиями на антибактериальную активность. В итоге получались растворы образцов в 50 % ПЭГ-400.

Методика проведения микробиологических исследований. Антибактериальную активность изучали на следующих штаммах микроорганизмов: *Escherichia coli* (ATCC 16404), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Результаты определяли визуально, уточняли и подтверждали турбидиметрическим методом.

Для исследования использовали бульонную культуру микроорганизмов. Для этого отбирали несколько однотипных изолированных колоний, петлёй переносили незначительное количество материала в пробирку с жидкой неселективной питательной средой (бульон Мюллер-Хинтона), инкубировали при температуре 37 °С. Стандартную бактериальную суспензию также готовили на бульоне Мюллер-Хинтона. Для этого микропипеткой со стерильным наконечником вносили исследуемую культуру в стерильный флакон со стерильным бульоном Мюллер-Хинтона и довели концентрацию микроорганизмов до значения 0,5 единиц стандарта мутности по McFarland.

Рабочий раствор исследуемых веществ готовили из основного раствора с использованием жидкой питательной среды (бульон Мюллер-Хинтона). Для этого в первую лунку вносили 100 мкл жидкой питательной среды и 100 мкл исследуемого раствора с получением концентрации исследуемого вещества 500 мкг/мл. Затем из первой лунки 100 мкл полученной смеси среды и рабочего раствора переносили во вторую лунку, содержащую 100 мкл жидкой питательной среды. Новым стерильным наконечником переносили 100 мкл из второй лунки в третью со 100 мкл жидкой питательной среды и так до пятой лунки, из которой 100 мкл удаляли.

Контроль антибактериальной активности растворителя производился следующим образом: 100 мкл 50 % ПЭГ-400

вносили микропипеткой в первую лунку, содержащую 100 мкл жидкой питательной среды. Затем из первой лунки 100 мкл смеси растворителя и бульона переносили во вторую лунку со 100 мкл жидкой питательной среды и так до пятой лунки, из которой 100 мкл смеси удаляли.

Для контроля обсеменённости растворителя и растворов 100 мкл растворителя ПЭГ-400 вносили микропипеткой в первую лунку, содержащую 100 мкл жидкой питательной среды. Далее из первой лунки 100 мкл смеси растворитель+среда переносили во вторую лунку со 100 мкл бульона и так до 5 лунки. Бактерии в лунки не вносили. 100 мкл растворов исследуемых веществ вносили в 5 лунок по такой же схеме без бактерий.

Учёт результатов ингибирования роста микроорганизмов проводили визуально по отсутствию помутнения и турбидиметрически. В качестве контроля применялся стандарт – раствор сульфаниламида в концентрации 1 мг/мл, рабочая концентрация составляла 500 мкг/мл.

Ингибирование роста микроорганизмов определяли на фотометре универсальном Ф300 ТП.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Конденсацией сульфаниламида с ароматическими альдегидами в абсолютном метаноле в присутствии в качестве ката-

лизатора ледяной уксусной кислоты синтезированы основания Шиффа II-VI. При использовании для конденсации гетероциклического альдегида вместо ожидаемого основания Шиффа получен полуаминаль I. Образование полуаминалей при конденсации ароматических альдегидов с ароматическими аминами является редкостью, однако известно, что при использовании гетероциклических альдегидов, например пиридоксаль, образуются полуаминали, перевод которых в основания Шиффа проводят с использованием кислотной формы катионитов [11].

Разновидностью данного метода является конденсация в абсолютном этаноле путем выдерживания реакционной смеси в воздушном термостате при температуре 65 °С.

Для поиска перспективных соединений с различными радикалами были выбраны альдегиды, содержащие гетероциклические фрагменты I, конденсированные ароматические радикалы VI, *m*-фенилен II, ферроценовую группировку V, фенил карбоксильную III, метилбензоатную IV. Формулы соединений приведены на рисунке.

Результаты испытаний антимикробной активности соединений I-VII, полученные методом серийных разведений [14], приведены в таблице. В качестве контрольного антибактериального лекарственного средства использовали стрептоцид (VIII).

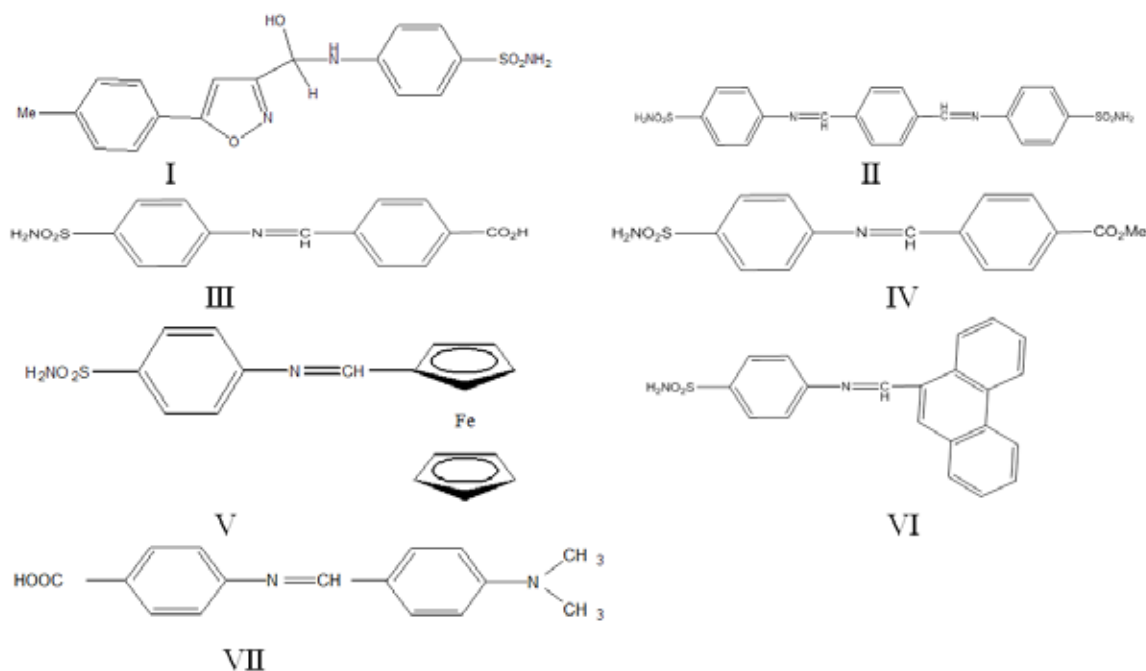


Рисунок. – Формулы исследованных соединений

Как видно из данных таблицы, контрольное лекарственное средство стрептоцид (**VIII**) проявлял активность при концентрации 500 мкг/мл только в отношении *Escherichia coli* и был неэффективен по отношению к другим бактериям. Соединения **I-V** также показали антибактериальную активность в отношении *Escherichia coli* в концентрации 500 мкг/мл. Соединения **III** и **IV** в этой же

концентрации проявили активность против споровой культуры *Bacillus subtilis*. На культуру *Staphylococcus aureus* антибактериальное действие оказали соединения **I** и **III** в концентрациях 500 и 250 мкг/мл соответственно. Соединение **III** обладало наиболее широким спектром антибактериальной активности и превосходило известные азометиновые производные сульфаниламида в 2 раза [2].

Таблица. – Антибактериальная активность полученных соединений

Соединение	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Концентрация	мкг/мл							
<i>Staphylococcus aureus</i>	500	+	250	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	500	500	500	500	500	+	+	500
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	500	500	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+

Примечание: «+» – наблюдается рост микробной культуры.

Ни одно из полученных азометиновых и полуаминальных производных сульфаниламида и *n*-аминобензойной кислоты не проявило активность в отношении *Pseudomonas aeruginosa*.

Исходя из полученных результатов, можно предположить, что замена фенильного радикала на 9-фенантроновый фрагмент и замена сульфаниламидного остатка на *n*-карбоксифенильный приводят к исчезновению активности.

Наиболее перспективными для дальнейших исследований являются производные пятичленных гетероциклов с двумя гетероатомами и производные сложных эфиров бензойной кислоты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования позволили разработать эффективную и простую методику синтеза оснований Шиффа, при помощи которой получено 7 образцов данного соединения.

Антибактериальная активность в отношении *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* и *Staphylococcus aureus* выявлена у 5 синтезированных соединений. Образцы **I** и **IV** превосходили сульфаниламид по широте спектра действия, а образец **III** – и по спектру действия, и по активности.

Обнаружена высокая антибактериальная активность азометинов, содержащих иминометилфенилалкоксикарбонильный фрагмент.

В работе установлено влияние строения азометинов на их антибактериальную

активность, что позволяет вести целенаправленный поиск новых, более эффективных соединений.

SUMMARY

S. G. Stepin, N. V. Zhaliyazniak,
O. G. Myradov, E. A. Dikumar
SYNTHESIS AND RESEARCH
OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY
OF SEMIAMINALS AND SCHIFF BASES
BASED ON SULFANILAMIDE

4- {[hydroxy(5-*p*-tolylisoxazol-3-yl)methyl]amino}benzenesulfonamide, 4,4'-(1*E*,1'*E*)-1,4-phenylenebis(methanylidene)bis(azanylydene)dibenzenesulfonamide, (*E*)-4-sulfamoylphenyl-iminomethylbenzoic acid, methyl(*E*)-4-sulfamoylphenyl-iminomethylbenzoate, (*E*)-4-ferrocenylmethylenaminebenzenesulfonamide, (*E*)-4-phenanthren-9-ylmethylenaminebenzenesulfonamide have been synthesized by the condensation of sulfanilamide with the appropriate aldehydes in absolute boiling methanol with the presence of acetic acid catalyst amounts. (*E*)-4-(*N*, *N*-dimethylaminophenyliminomethyl) benzoic acid has been synthesized by incubation of ethanol solutions of *n*-aminobenzoic acid and *p*-dimethylaminobenzaldehyde in the ultrathermostatic oven at 65 °C with concentrated acetic acid as the catalyst.

The structure of newly synthesized substances has been validated by IR- and UV-spectroscopy and mass-spectrometry. The period of the reaction lasted for 30–60 min resulting in

80–90% yield of the final products. The micro-method of serial dilutions has been used for the assessment of antibacterial activity of the synthesized compounds relating to the cultures of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, and *Staphylococcus aureus*. The selection of the most appropriate solvent and its concentration range has been previously determined for microbiological research. Antibacterial activity of final compounds has been evaluated by the visual method and validated by turbidimetry. The antimicrobial activity of 5 compounds studied relating to *E.coli*, *B.subtilis* and *S.aureus* has been detected. The highest antibacterial activity has been associated with azomethins containing iminomethyl-phenyl-alcoxycarbonyl moiety.

Keywords: sulfanilamide, *n*-aminobenzoic acid, Schiff bases, semiaminals, aromatic aldehydes, antibacterial activity.

ЛИТЕРАТУРА

1. Основания Шиффа [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://appteka.ru/encik/encik_o/osnovaniya_shiffa.htm. – Дата доступа: 24.02.2019.

2. Apoorva Gupta. Synthesis and *in vitro* antibacterial screening of some new azomethines derived from sulphonamides / Gupta Apoorva, A. K. Halve // International journal of current pharmaceutical research. – 2015. – № 7(1). – P. 17–20.

3. Gomathi, Vellaiswamy. Synthesis, spectral characterization and antimicrobial screening of novel Schiff bases from sulfa drugs / Vellaiswamy Gomathi, Ramaswamy Selvameena // International journal of current pharmaceutical research. – 2014. – № 6(1). – P. 487–491.

4. Biological studies on derivatives of sulfanilamide and sulfathiazole / N. Elango-van [et al.] // International journal of current research in chemistry and pharmaceutical sciences. – 2016. – № 3(9). – P. 60–65.

5. Naeimi, H. Novel Organotin(IV)-Schiff Base Complexes: Synthesis, Characterization, Antimicrobial Activity, and DNA Interaction Studies / H. Naeimi, J. Safari, A. Heidarneshad // Dyes and Pigments. – 2007. – Vol. 73. – P. 251–253.

6. Synthesis, Characterization of Poly(E)-3-amino-4-((3-bromophenyl)diazonyl)-1H-pyrazol-5-ol: Investigation of Antibacterial Activity, Fluorescence, and Optical Properties / Turan, E. [et al.] // Fibers and Polymers. – 2012. – Vol. 13, № 4. – P. 415–424.

7. Ahamad, T. Thermal, microbial, and corrosion resistant metal-containing poly(Schiff) epoxy coatings / T. Ahamad, S.M. Alshehri // J. Coat. Technol. Res. – 2012. – Vol. 9, № 5. – P. 515–523.

8. Synthesis, Characterization and Antibacterial and Antifungal Studies of Schiff base Polymers derived from Methylene bis Cinnamaldehyde / M. A. Mughal [et al.] // IOSR Journal of Engineering. – 2013. – Vol. 3, № 10. – P. 48–55.

9. The role of a Schiff base scaffold, N-(2-hydroxy acetophenone) glycinate in overcoming multidrug resistance in cancer / A. Ganguly [et al.] // Eur. J. Pharm. Sci. – 2014. – Vol. 51. – P. 96–109.

10. Sriram, D. Newer aminopyrimidin-imino isatin analogues as nonnucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors for HIV and other opportunistic infections of AIDS: design, synthesis and biological evaluation / D. Sriram, T. R. Bal, P. Yogeewari // Il Farmaco. – 2005. – Vol. 60. – P. 377–384.

11. Синтез оснований Шиффа из фурилакролеинов и аминопиридинов в присутствии молекулярных сит / И. Иовель [и др.] // ХГС. – 2000. – № 3. – С. 324–335.

12. Жакина, А. Х. Биологические свойства *n*-аминобензойной кислоты и ее производных / А. Х. Жакина // Изв. НАН Республики Казахстан, сер. химическая. – 2010. – № 3. – С. 25–31.

13. Синтез (Е)-азометинов на основе 3-(4)-аминобензойных кислот, сульфаниламида и 4-аминоазобензола / Е. А. Дикусар [и др.] // Вестник Фармации. – 2016. – № 4. – С. 45–53.

14. Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: инструкция по применению № 226-1200; утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 15.12.2008 / разработчик ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья». – Минск, 2008. – С. 6.

Адрес для корреспонденции:

210023, Республика Беларусь,
г. Витебск, пр. Фрунзе, 27,
УО «Витебский государственный ордена
Дружбы народов медицинский университет»,
кафедра органической химии,
тел моб. +375-29-2198643,
e-mail: stepins@tut.by,
Стёпин С.Г.

Поступила 23.05.2019 г.